

بررسی پیوستگی ژنتیکی لوکوس DFNB59 و ناشنوایی غیر سندرمی مغلوب اتوزومی در خانواده‌هایی از سه استان غربی ایران

نجمه فتاحی^۱، محمد امین طباطبایی فر^۲، سمیه رئیسی^۱، پریا علی پور^۱، اعظم پوراحمدیان^۱

مرتضی هاشم زاده چالستری^{۱*}

^۱دانشجو، کمیته تحقیقات دانشجویی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ ^۲دانشگاه

علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۳۱

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۳۱

چکیده:

زمینه و هدف: نقص شنوایی حسی-عصبی دو طرفه یکی از شایع ترین نقص‌های مادرزادی است که دارای شیوع یک در هزار در بین نوزادان می‌باشد. ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب یک اختلال بسیار هتروژن بوده که تا کنون بیش از ۷۰ لوکوس و حدود ۵۰ ژن برای آن شناخته شده است. در پژوهش حاضر، غربالگری لوکوس DFNB59 با هدف تعیین سهم این لوکوس در ۳ استان همدان، کهگیلویه و بویر احمد و چهارمحال و بختیاری انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی جهش‌های DFNB59 (PJKV) در ۵۴ خانواده در ۳ استان از ایران که شامل همدان، کهگیلویه و بویر احمد و چهارمحال و بختیاری بررسی شد. ژن موجود در این لوکوس Pejvakin (PJKV) است که پروتئین پژواکین را کد کرده و باعث انتقال تحریکات عصبی می‌شود. خانواده‌های انتخاب شده در مطالعه، دارای ازدواج خویشاوندی بوده و حداقل ۲ ناشنوا و بیشتر بودند و همچنین از نظر جهش GJB2 منفی بودند. برای این لوکوس ۶ نشانگر (Short Tandem Repeat= STR) انتخاب شده که بعد از واکنش PCR بر روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز شدند و آنالیز پیوستگی بر روی آن‌ها انجام شد.

یافته‌ها: با بررسی خانواده‌های مختلف، هیچ کدام در نشانگرهای مورد نظر با لوکوس DFNB59 پیوستگی نشان ندادند و مطالعه‌ی حاضر حاکی از آن است که جهش‌های ژن پژواکین در ایجاد ناشنوایی در استان‌های مذکور احتمالاً نقش اندکی دارند.

نتیجه‌گیری: بر اساس مطالعه حاضر جهش‌های ژن PJKV از نظر بالینی اهمیت چندانی در بروز بیماری نقص شنوایی حسی-عصبی دو طرفه در سه استان همدان، کهگیلویه و بویر احمد و چهارمحال و بختیاری ندارند.

واژه‌های کلیدی: لوکوس DFNB59، ژن پژواکین، ناشنوایی غیر سندرومیک مغلوب اتوزومی، پیوستگی ژنتیکی.

مقدمه:

ارثی می‌باشد (۲،۱). تقریباً ۷۰ درصد موارد ناشنوایی ارثی، غیر سندرمی (Non-syndromic Hearing Loss= NSHL) می‌باشد که الگوی اصلی وراثت آن اتوزومی مغلوب است (۵-۲).

بیماری‌های با وراثت مغلوب در جمعیت‌هایی که ازدواج‌های خویشاوندی در آن‌ها معمول‌تر است،

ناشنوایی یکی از شایع‌ترین اختلالات حسی عصبی در انسان است. بیش از ۷۰ میلیون فرد در سراسر جهان دارای نقص شنوایی هستند. بر طبق مطالعات اپیدمیولوژیک بر روی ناشنوایی بیش از تکلم، ۱ در ۱۰۰۰ نوزاد مبتلا به ناشنوایی شدید (Sever) تا عمیق (Profound) می‌باشند که بیش از ۵۰ درصد از این موارد

شایع ترند. چنین اثری در موارد مغلوب ناشنوایی نیز مشاهده شده است. ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب (Autosomal Recessive Non-syndromic Hearing Loss= ARNSHL) شایع ترین دلیل ناشنوایی ارثی است و اغلب شدیدترین فنوتیپ ناشنوایی را نشان می دهد (۶).

تاکنون بیش از ۱۰۰ لوکوس در NSHL شناخته شده است؛ بنابراین ناشنوایی از جمله هتروژن ترین صفات ژنتیکی محسوب می شود. با توجه به هتروژنیستی بالا در مورد این بیماری، محققان، مطالعه خانواده های بزرگ را در جمعیت هایی مثل جمعیت های خاورمیانه که فراوانی ازدواج خویشاوندی در آن ها بالا می باشد، پیشنهاد کرده اند (۷).

جهش در دو ژن GJB2 و GJB6 عامل ۵۰ درصد موارد ARNSHL است، با این حال مطالعات در ایران نشان داده که سهم جهش ژن GJB2 در بروز ناشنوایی در جمعیت های مختلف ایرانی متفاوت می باشد و از بیشترین موارد جهش در مناطق شمالی تا عدم مشاهده جهش در مناطق شرقی (سیستان و بلوچستان) می باشد (۹۸). تاکنون جهش در سایر ژن های مرتبط با ناشنوایی نیز تنها در خانواده های محدودی از جمعیت ایرانی شناسایی شده است و به نظر می رسد، جهت تعیین سهم دقیق هر کدام از این ژن ها در بروز ناشنوایی در جمعیت ایرانی، مطالعات بسیار گسترده تری مورد نیاز باشد؛ بنابراین، کشورمان از نظر بیماری های مغلوب از جمله ARNSHL و شناسایی جهش ها و لوکوس های جدید مربوطه، جهت مدیریت بیماری، انجام مشاوره ژنتیک و اقدامات درمانی احتمالی حائز اهمیت است. در این مطالعه برای بررسی لوکوس DFNB59 و مشخص کردن جهش های احتمالی از روش آنالیز پیوستگی ژنتیکی بهره گرفته شد.

اساس مطالعه پیوستگی ژنتیکی، نقشه اتوزیگوستی است که اولین بار توسط Botstein و Lander پیشنهاد گردید و روش انتخابی برای مطالعه ژنتیک بیماری های اتوزومی مغلوب می باشد (۱۰).

ژن پژواکین در لوکوس DFNB59 شناسایی شده است. توالی کامل ژن را از کتابخانه cDNA مربوط به بافت بیضه انسانی جدا و محصول ژنی را به نام پژواکین، که از کلمه فارسی بازتاب (echo) منشأ گرفته است، نامگذاری شد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۶ انجام شد، موتاسیون های موجود در این ژن را به عنوان عامل ناشنوایی عصبی در ۴ خانواده ایرانی گزارش کردند. ژن DFNB59 شامل ۷ اگزون است که ۹/۸ kb از ژنوم را به خود اختصاص داده است. این ژن بر روی کروموزوم ۲ (2q31.2) قرار دارد و اولین اگزون آن غیر کد کننده می باشد. پروتئینی که این ژن کد می کند شامل ۳۵۲ اسید آمینه می باشد که البته شواهد نشان داده است که این پروتئین یک پروتئین ترانس ممبران نمی باشد؛ ولی دارای سیگنال ورود به هسته بوده و در اجسام سلولی نورون های مسیر شنوایی متمرکز شده است. در بررسی های انجام شده در سرتاسر جهان تاکنون ۹ موتاسیون از این ژن شناسایی شده است. با این وجود، اطلاعات محدودی در رابطه با نوع و فراوانی موتاسیون ها در ژن کد کننده پژواکین در جمعیت های مختلف وجود دارد (۱۱)

پژوهش حاضر، با هدف غربالگری اولیه نمونه های ناشنوایی شایع تر شامل GJB2 انجام شد. در مرحله بعد، تجزیه و تحلیل پیوستگی مربوط به لوکوس DFNB59 در خانواده هایی که برای جهش در ژن مورد بررسی منفی بودند صورت گرفت.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد اجرا شده است، نمونه مربوط به ۵۴ خانواده مبتلا به ARNSIL که دارای حداقل دو بیمار، والدین سالم و در صورت امکان دارای ازدواج خویشاوندی بودند که ۳۰ خانواده از استان چهارمحال و بختیاری و ۱۰ خانواده از کهگیلویه و بویراحمد و ۱۴ خانواده از همدان انتخاب شدند. نمونه گیری خون این افراد در سال ۸۹ توسط مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی

شهرکرد، پس از تکمیل پرسشنامه و ارزیابی‌های بالینی و پس از اخذ رضایت‌نامه آگاهانه از کلیه افراد شجره‌نامه، انجام شده و از هر فرد به میزان ۵ میلی‌لیتر خون در لوله‌های حاوی EDTA نیم مولار، اخذ گردیده بود. DNA ژنومیک با روش فنل کلروفرم به صورت استاندارد استخراج و با دستگاه نانو دراپ از لحاظ کمی بررسی گردید (۱۰). تنها افراد فاقد جهش در اگزون ۲ ژن GJB2 در این مطالعه وارد شدند. برای وجود ارتباط ناشنوائی با ژن PJKV (مسبب ناشنوائی واقع در لوکوس DFNB59)، از طریق آنالیز پیوستگی بررسی گردید. انتخاب نشانگرهای STR مناسب توسط پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI genome browser Map viewer و انتخاب

پرایمرهای لازم جهت تکثیر STR ها از طریق پایگاه داده NCBI UniSTS انجام شد (جدول شماره ۱). معیار انتخاب نشانگرها فاصله از ژن، درجه چندشکلی آن‌ها، دامنه و طول محصول PCR، دارا بودن کمترین حد باندهای ثانویه یا stutter band و از همه مهم‌تر هتروزیگوت بودن پدر و مادر برای یک نشانگر معین بود. همه نشانگرها دارای واحدهای تکراری دو نوکلئوتیدی بودند. در صورتی که برای هریک از خانواده‌های مورد مطالعه، نشانگرها بی‌معنی (Uninformative) بودند، از دیگر نشانگرهای موجود در منطقه‌ی ژنی مربوطه استفاده می‌شود.

جدول شماره ۱: نشانگرهای مورد استفاده و ویژگی‌های آن‌ها

| نام نشانگر | پرایمرها | اندازه محصول (bp) | هتروزیگوسیتی |
|------------|----------|-------------------|--------------|
| D2S324 | Forward | ۲۶۴-۲۷۵ | ۶۸ درصد |
| | Reverse | | |
| D2S2261 | Forward | ۱۰۰-۱۴۸ | ۸۷ درصد |
| | Reverse | | |
| D2S2173 | Forward | ۲۰۱-۲۴۳ | ۶۰ درصد |
| | Reverse | | |
| D2S1244 | Forward | ۳۵۰-۳۶۰ | ۸۵ درصد |
| | Reverse | | |
| D2S1391 | Forward | ۱۰۹-۱۳۳ | ۷۹ درصد |
| | Reverse | | |
| D2S148 | Forward | ۱۸۰-۲۰۰ | ۶۲ درصد |
| | Reverse | | |

برای تکثیر نشانگرها از روش PCR گرادیانت دمایی (Touchdown PCR) استفاده شد. در این روش در چند سیکل شروع PCR دمای Annealing از چند درجه بالاتر شروع می‌شود تا پرایمرها اختصاصی‌تر به محل مورد نظر در ژن اتصال پیدا کنند و سپس PCR دمای واقعی Annealing ادامه می‌یابد (جدول شماره ۲).

هر نمونه واکنش PCR شامل: بافر X10PCR (۱ میلی مول) ۲/۵ μ l، ۰/۵ μ l (۱۰ پیکومول) از هر پرایمر، Mixed dNTP (۱۰ میلی مول) ۰/۵ μ l، $MgCl_2$ (۵۰ میلی مول) ۱ μ l، آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد) ۰/۱ μ l و ۲ μ l DNA (۴۰-۵۰ Ng/ μ l) که با ddH₂O به حجم ۲۵ μ l رسانده شد.

جدول شماره ۲: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (Touchdown PCR)

| مراحل PCR | مرحله | دما (درجه سانتی‌گراد) | زمان | تعداد سیکل |
|-----------|---------------------|-----------------------|----------|------------|
| سیکل ۱ | دنا تورا سیون اولیه | ۹۵ | ۳ دقیقه | ۱ |
| سیکل ۲ | دنا تورا سیون | ۹۵ | ۳۰ ثانیه | ۱۰ |
| | اتصال | ۶۲-۵۳* | ۴۵ ثانیه | |
| | طویل سازی | ۷۲ | ۳۰ ثانیه | |
| سیکل ۳ | دنا تورا سیون | ۹۵ | ۳۰ ثانیه | ۲۵ |
| | اتصال | ۵۲ | ۴۵ ثانیه | |

| | | |
|------------------|----|----------|
| طولیل سازی | ۷۲ | ۳۰ ثانیه |
| سیکل ۴ | ۷۲ | ۷ دقیقه |
| طولیل سازی نهایی | ۱ | |

*دمای اتصال پرایمر برای هر نشانگر متغیر بوده و در محدوده ۵۳-۶۲ درجه بوده است.

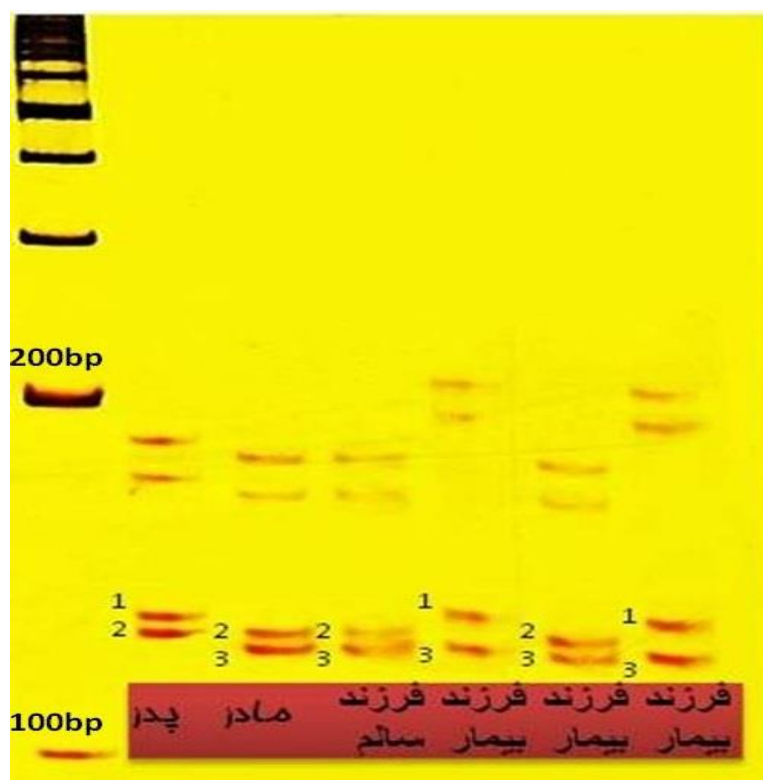
عمیق داشتند. در ۸۵ درصد خانواده‌های مورد بررسی سه نسل ازدواج خویشاوندی دیده شد و باتوجه به داده‌های در ارتباط با شجره‌نامه، غیر سندرمی بودن ناشنوایی و الگوی توارث اتوزومی مغلوب مورد تأیید بود. ارزش Slink این خانواده‌ها که با نرم‌افزار FastSlink version 2.51 محاسبه شده‌اند؛ بین ۲ تا ۷ برآورد شده است. در ۵۴ خانواده مورد مطالعه بعد از بررسی الگوی نشانگرها و با تکرار دو بار یا بیشتر الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید (برای خانواده‌های دارای ارزش Slink بالاتر) پیوستگی رد شد. به این صورت که تمامی افراد خانواده برای نشانگر مورد نظر به صورت هتروزیگوت دیده شدند (تصویر شماره ۱)، البته بعضی نشانگرها الگوی پیوستگی نشان دادند؛ اما در نهایت با رسم هاپلوتیپ با استفاده از نرم‌افزار HaploPainter الگوی پیوستگی به لوکوس DFNB59 تأیید نشد (تصویر شماره ۲).

بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR، نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌آکریل آمید (Merk, Germany) ۸-۱۲ درصد، با جریان ۵۰ mA به مدت ۲-۴ ساعت الکتروفورز شد و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی گردید و باندها رؤیت گردید.

برای محاسبه‌ی Slink از FastSlink version 2.51 و برای محاسبه‌ی نمره‌ی LOD (LOD score) پارامتری دو نقطه‌ای و چند نقطه‌ای به ترتیب از Superlink version 1.6 و Simwalk version 2.91 استفاده شد (۱۲، ۱۳). رسم هاپلوتایپ در مورد خانواده‌های مشکوک به پیوستگی (مجموعه‌ی ژنوتیپ نشانگرهای مجاور) با کمک نرم‌افزار HaploPainter version 029.5 صورت گرفت. این مرحله به منظور تأیید یا رد پیوستگی استفاده می‌شود (۱۴).

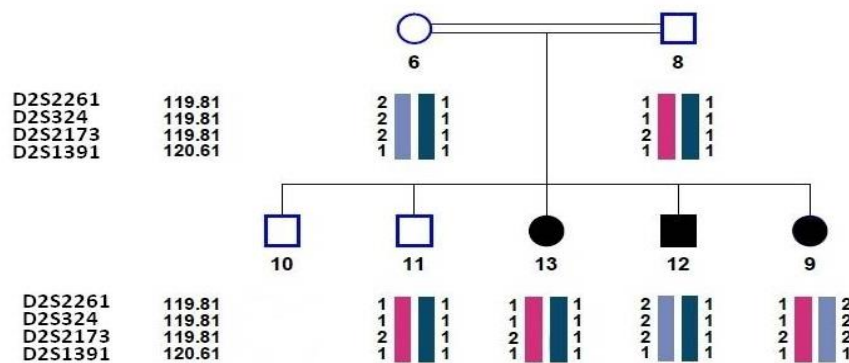
یافته‌ها:

اکثر افراد مورد مطالعه در جمعیت مورد بررسی، ناشنوایی دو طرفه‌ی حسی عصبی شدید تا



تصویر شماره ۱: نتیجه بررسی تکثیر نشانگر D2S2261 بر روی ژل پلی آکریل آمید

افراد بیمار الگوی هتروزیگوت را در باندهای مربوط به نشانگر نشان دادند.



تصویر شماره ۲: هاپلوتاایپ مربوط به عدم پیوستگی در یکی از خانواده های مورد بررسی

در این شجره نامه بیماران هاپلوتایپ یکسانی ندارند و پیوستگی به لوکوس *DFNB59* رد می شود. نقشه ژنتیکی نشانگرها بر اساس مارشیلد می باشد.

بحث:

کشورمان دارند و از نظر اهمیت، احتمالاً بعد از جهش های ژن *GJB2* (کانکسین ۲۶) در کشور می باشند (۱۹). با این وجود مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان انجام شده است نشان داده که موتاسیون های ژن پژواکین نقش زیادی در ایجاد ناشنوایی ندارند. در بررسی هایی که بر روی ۶۸ خانواده ترک و ۸۳ فرد هلندی انجام شد. تنها موتاسیون $C>T$ ، ۴۹۹ در افراد ترک و ۵۱۲-۵۰۹ $\Delta CACT$ و ۳۱ $T>G$ در افراد هلندی شناسایی شد (۱۷)؛ همچنین در مطالعه ای بر روی خانواده ای بزرگ با اختلال شنوایی در مراکش تنها یک موتاسیون ۱۱۳-۱۱۴ $ins T$ گزارش شد (۱۶). اخیراً مطالعه دیگری نیز بر روی خانواده های چینی انجام شده است که در این مطالعه هیچ گونه تغییری در این ژن یافت نشده است. مطالعه دیگری بر روی ۱۵ لوکوس دخیل در ناشنوایی غیر سندرمی اتوزومی مغلوب انجام گرفت، از جمله لوکوس *DFNB59* را به روش پیوستگی مورد بررسی قرار دادند. از ۶۷ خانواده ای که مطالعه کردند هیچ کدام به این لوکوس پیوستگی نشان ندادند (۲۰).

در این مطالعه ۵۴ خانواده با حداقل دو فرد ناشنوا از استان های همدان، کهگیلویه و بویر احمد و چهارمحال و بختیاری از نظر پیوستگی به لوکوس *DFNB59* بررسی شدند. بررسی های مختلفی بر روی این ژن در خانواده های ایرانی و غیر ایرانی انجام شده است (۱۷-۱۵).

دو موتاسیون ۱۶۱ $C>T$ و ۵۴۷ $C>T$ از این ژن در خانواده های ایرانی شناسایی و گزارش شده است (۱۱). در مطالعه حاضر نیز ما ناشنوایی وابسته به ژن کد کننده پژواکین را که از نوع ناشنوایی غیر سندرومیک پیش از تکلم با توارث اتوزومال مغلوب می باشد، را بررسی کردیم. مطالعه ما برای تعیین فراوانی موتاسیون در این ژن و ارتباط آن با ناشنوایی انجام شده است (۱۱). مطالعات دیگر انجام شده بر روی خانواده های ایرانی منجر به شناسایی موتاسیون ΔA ۱۲۲ در ژن *PJVK* گردیده است (۱۵). در چهارمحال و بختیاری و گیلان دو موتاسیون ΔT 726, ΔG 988 گزارش شده است (۱۸). مطالعات نشان دادند که جهش های ژن *DFNB59* سهمی حدود ۶/۷ درصد در ایجاد ناشنوایی در

بنابراین با توجه به مطالعات انجام شده نقش لوکوس DFN59 در فهم شیوع ژن‌هایی مثل PJVK مهم می‌باشد و می‌توان آن را برای غربالگری در مراکز مشاوره‌ای و بالینی مورد توجه قرار داد. مطالعه در این زمینه می‌تواند مقدمه‌ای برای بررسی جمعیت‌های دیگر در مناطق مختلف کشور باشد؛ همچنین می‌توان سایر لوکوس‌ها را نیز در جمعیت مورد مطالعه بررسی نمود. با توجه به این‌که خانواده‌های مورد مطالعه ارزش Slink بالایی داشتند و اینکه در این ژن هیچ موتاسیونی یافت نشد، احتمال درگیر بودن ژن‌هایی مثل SLC26A4 در این استان‌ها وجود دارد. با توجه به اینکه در مطالعاتی که در سال ۲۰۱۰ انجام شده بود از ۳۰ خانواده ۳ خانواده به لوکوس DFN4 پیوستگی نشان دادند. بررسی این لوکوس قبل از بررسی لوکوس‌های دیگر الزامی به نظر می‌رسد (۲۱). نتایج این گونه پژوهش‌ها می‌تواند به‌طور قابل توجهی به غربالگری ناشنوایی در جمعیت‌های ایرانی و به دنبال آن مشاوره ژنتیک اصولی و همچنین تشخیص پیش از لانه‌گزینی (PGD) و تداخل درمانی آینده به منظور جلوگیری از آن کمک کند.

نتیجه گیری:

منابع:

1. Kitamura K, Takahashi K, Tamagawa Y, Noguchi Y, Kuroishikawa Y, Ishicawa K, et al. Deafness genes. *J Med Dent Sci*. 2000; 47: 1-11.
2. Genc GA, Konukseven O, Muluk NB, Kirkim G, Basar FS, Tuncer U, et al. Features of unilateral hearing loss detected by newborn hearing screening programme in different regions of Turkey. *Auris Nasus Larynx*. 2013; 40(3): 251-9.
3. Morton NE. Genetic epidemiology of hearing impairment. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 630: 16-31.
4. Dror AA, Avraham KB. Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet*. 2009; 43: 411-37.
5. Van Laer L, Cryns K, Smith RJ, Van Camp G. Nonsyndromic hearing loss. *Ear Hear*. 2003; 24(4): 275-88.
6. Imtiaz F, Taibah K, Ramzan K, Bin-Khamis G, Kennedy S, Al-Mubarak B, et al. A comprehensive introduction to the genetic basis of non-syndromic hearing loss in the Saudi Arabian population. *BMC Med Genet*. 2011; 12: 91.
7. Hartl DL, Clark AG. Principles of population genetics: Sinauer associates Sunderland; 1997.
8. Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*. 1987; 236(4808): 1567-70.
9. Naghavi A, Nishimura C, Kahrizi K, Riaz Ay, Suraki Aliabadi H, Mahdieh N, et al. Prevalence of Gjb2 mutations among patients with autosomal recessive non syndromic hearing loss in Sistan and Baloochestan Province. *Zahedan J Res Med Sci*. 2005; 7(2): 85-92.

با توجه به نتایج این مطالعه، لوکوس DFN59 احتمالاً نقش کم‌رنگ تری در ایجاد ناشنوایی در جمعیت‌های نواحی بررسی شده دارد و دلیل اصلی ناشنوایی در جمعیت مورد مطالعه می‌تواند مربوط به سایر لوکوس‌های درگیر در ناشنوایی باشد. با این حال برای تعیین نقش دقیق‌تر این لوکوس در کشورمان مطالعات بیشتر در سایر جمعیت‌های موجود در این مناطق و تعداد خانواده‌های بیشتر و همچنین سایر مناطق می‌باشد تا بتوان با مشخص کردن نقش لوکوس DFN59 در مشاوره ژنتیک و پیشگیری از ناشنوایی افقی تازه باز کرد.

تشکر و قدردانی:

با تشکر فراوان از بیماران ناشنوا و خانواده‌های ایشان که در انجام این پروژه ما را یاری رساندند. این مقاله مربوط به نتایج پایان نامه نویسنده نفر اول می‌باشد. از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد با شماره گرنت ۱۵۹۹، جهت تأمین بودجه و همه‌ی کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی که در این مطالعه ما را یاری کردند، کمال تقدیر و تشکر را داریم.

10. Grimberg J, Nawoschik S, Belluscio L, McKee R, Turck A, Eisenberg A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(20): 8390.
11. Delmaghani S, del Castillo FJ, Michel V, Leibovici M, Aghaie A, Ron U, et al. Mutations in the gene encoding pejvakin, a newly identified protein of the afferent auditory pathway, cause DFNB59 auditory neuropathy. *Nat Genet.* 2006; 38(7): 770-8.
12. Moser T, Predoehl F, Starr A. Review of hair cell synapse defects in sensorineural hearing impairment. *Otol Neurotol.* 2013; 34(6): 995-1004.
13. Ott J. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989; 86(11): 4175-8.
14. Tabatabaiefar MA, Alasti F, Shariati L, Farrokhi E, Franssen E, Nooridalooi MR, et al. DFNB93, a novel locus for autosomal recessive moderate-to-severe hearing impairment. *Clin Genet.* 2011; 79(6): 594-8.
15. Schwander M, Sczaniecka A, Grillet N, Bailey JS, Avenarius M, Najmabadi H, et al. A forward genetics screen in mice identifies recessive deafness traits and reveals that pejvakin is essential for outer hair cell function. *J Neurosci.* 2007; 27(9): 2163-75.
16. Ebermann I, Walger M, Scholl HP, Charbel Issa P, Luke C, Nurnberg G, et al. Truncating mutation of the DFNB59 gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. *Hum Mutat.* 2007; 28(6): 571-7.
17. Collin RW, Kalay E, Oostrik J, Caylan R, Wollnik B, Arslan S, et al. Involvement of DFNB59 mutations in autosomal recessive nonsyndromic hearing impairment. *Hum Mutat.* 2007; 28(7): 718-23.
18. Hashemzadeh Chaleshtori M, Simpson MA, Farrokhi E, Dolati M, Hoghooghi Rad L, Amani Geshnigani S, et al. Novel mutations in the pejvakin gene are associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Iranian families. *Clin Genet.* 2007; 72(3): 261-3.
19. Hashemzadeh Chaleshtori M, Simpson MA, Farrokhi E, Dolati M, Hoghooghi Rad L, Amani Geshnigani S, et al. Novel mutations in the pejvakin gene are associated with autosomal recessive non-syndromic hearing loss in Iranian families. *Clin Genet.* 2007; 72(3): 261-3.
20. Tabatabaiefar M, Alasti F, Zohour MM, Shariati L, Farrokhi E, Farhud D, et al. Genetic linkage analysis of 15 DFNB loci in a group of Iranian families with autosomal recessive hearing loss. *Iran J Public Health.* 2011; 40(2): 34.
21. Tabatabaiefar MA, Shariati L, Montazer-Zohour M, Ashrafi K, Saffari-Chaleshtori J, Ghasemikhah R, et al. Mutation screening of GJB2 and GJB6 and genetic linkage study of three prevalent DFNB loci in Iranian families with autosomal recessive non-syndromic hearing loss. *J Shahrekord Univ Med Sci.* 2010; 12(2): 65-75.

Genetic linkage analysis of DFNB59 loci involved in autosomal recessive non-syndromic hearing loss (ARNSHL) in 3 western provinces of Iran

Fattahi N¹, Tabatabaie Far MA², Reisi S¹, Alipour P¹, Pourahmadian A¹, Hashemzadeh-Chaleshtori M^{1*}

¹Student, Student Research Committee, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran; ²Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 22/Sep/2015 Accepted: 22/Sep/2015

Background and aims: Bilateral sensorineural hearing loss is one of the most frequent congenital defects, and it has the prevalence of one in thousand among the infants. ARSNHL is a very heterogenic defect for over 70 loci and 50 genes have been found. In the present study, screening of DFNB59 loci performed with aim of determining the contribution of this locus in Hamedan, Kohgiluyeh and Boyer Ahmad and Chaharmahal and Bakhtiari provinces.

Methods: In this laboratory descriptive study, DFNB59 mutations in 54 families from 3 provinces of Iran including Hamedan, Kohgiluyeh and Boyer Ahmad, and Chaharmahal and Bakhtiari were studied. The gene (PJK) in this locus encodes Pejvakin protein (PJK) and causes tranfer nerve stimulation. Selected families in this study had consanguinity and they had at least 2 patients with the defect. They also were negative in having the GJB2 mutations. 6 STR markers were selected for these loci. By PCR amplification, electrophoresis on polyacrylamide gel was done and linkage analysis was performed.

Results: After examining different families, it was revealed that none of them had linkage to the DFNB59 locus. Therefore, this study shows that Pejvakin mutations do not play an important role in causing HL in these provinces.

Conclusion: According to the present study, it suggests that Pejvakin mutations might not play an important role in appearance of bilateral sensorineural hearing loss in these provinces including Hamedan, Kohgiluyeh and Boyer Ahmad and Chaharmahal and Bakhtiari.

Keywords: DFNB59 locus, PJK gene, Autosomal recessive non-syndromic hearing loss, Genetic linkage.

Cite this article as: Fattahi N, Tabatabaie Far MA, Reisi S, Alipour P, Pourahmadian A, Hashemzadeh-Chaleshtori M. Genetic linkage analysis of DFNB59 loci involved in autosomal recessive non- syndromic hearing loss (ARNSHL) in 3 western provinces of Iran. J Shahrekord Univ Med Sci. 2015; 17(4): 39-46.

***Corresponding author:**

Student Research Committee, Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, I.R. Iran, Tel: 00983833346692, E-mail: fattahi.najmeh@gmail.com